

WO9950447

**METHOD AND NUCLEIC ACID COMPOUND FOR BREAKING DOWN
NUCLEIC ACID MOLECULES SYNTHESIZED *IN VITRO***

MIRA DIAGNOSTIKA GMBH

Inventor(s): ;LEISER, Robert-Mathias ;TEMPER, Jochen ;PLOBNER, Lutz
;ZAVRIEV, Sergei

Application No. EP9902248 , **Filed** 19990326 , **A1 Published** 19991007 ,

Abstract:

The invention relates to a method for breaking down nucleic acid molecules, comprising the following steps: in a nucleic acid molecule to be broken down nucleosides of said nucleic acid molecule are converted by a chemical modification reaction into nucleoside analogues which are recognized by nucleic acid glycosylases as their substrate; the nucleic acid glycosylase is added to a sample containing the nucleic acid molecule to be broken down; and the nucleic acid to be broken down is broken down by reaction with the added nucleic acid glycosylase. The invention also relates to nucleic acid compounds which in the polymer chain have at least one structural unit having at least one recognition site for nucleases, glycosylases and/or methylases and at least one transformable group which frees the recognition site after a transformation.

Int'l Class: C12Q00168 C07H01906 C07H01916 C07D40504 C07D23954 C07D47330
C07H01900

Priority: DE 198 13 689.7 19980327

Designated States: AE AL AU BA BB BG BR CA CN CU CZ DE EE GD GE HR HU
ID IN IS JP KP KR LC LK LR LT LV MG MK MN MX NO NZ PL RO SG SI SK SL
TR TT UA US UZ VN YU ZA GH GM KE LS MW SD SL SZ UG ZW AM AZ BY KG
KZ MD RU TJ TM AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE
BF BJ CF CG CI CM GA GN GW ML MR NE SN TD TG

Foreign Abstract: NotAvailable

Patent Family:

AU 3419499 A1 19991018 AU 34194 A 19990326

DE 19813689 A 19980327

WO 9902248 W 19990326

WO 9950447 A1 19991007 DE 19813689 A 19980327

WO 9902248 A 19990326

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12Q 1/68, C07H 19/06, 19/16, C07D 405/04, 239/54, 473/30, C07H 19/00		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/50447
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	7. Oktober 1999 (07.10.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/02248		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, DE, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IN, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 26. März 1999 (26.03.99)			
(30) Prioritätsdaten: 198 13 689.7 27. März 1998 (27.03.98) DE			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MIRA DIAGNOSTIKA GMBH [DE/DE]; im GIZ Leverkusen, Hemmelrather Weg 201, D-51377 Leverkusen (DE).		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LEISER, Robert-Mathias [DE/DE]; (DE). TEMPER, Jochen [DE/DE]; (DE). PLOBNER, Lutz [DE/DE]; MIRA Diagnostika GmbH, im GIZ Leverkusen, Hemmelrather Weg 201, D-51377 Leverkusen (DE). ZAVRIEV, Sergei [RU/DE]; MIRA Diagnostika GmbH, im GIZ Leverkusen, Hemmelrather Weg 201, D-51477 Leverkusen (DE).			
(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; von Kreisler, Selt-ing, Werner, Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).			
(54) Title: METHOD AND NUCLEIC ACID COMPOUND FOR BREAKING DOWN NUCLEIC ACID MOLECULES SYNTHESIZED IN VITRO			
(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND NUCLEINSÄUREVERBINDUNG ZUM ABBAU VON IN-VITROSYNTHETISIERTEN NUCLEINSÄUREMOLEKÜLEN			
(57) Abstract <p>The invention relates to a method for breaking down nucleic acid molecules, comprising the following steps: in a nucleic acid molecule to be broken down nucleosides of said nucleic acid molecule are converted by a chemical modification reaction into nucleoside analogues which are recognized by nucleic acid glycosylases as their substrate; the nucleic acid glycosylase is added to a sample containing the nucleic acid molecule to be broken down; and the nucleic acid to be broken down is broken down by reaction with the added nucleic acid glycosylase. The invention also relates to nucleic acid compounds which in the polymer chain have at least one structural unit having at least one recognition site for nucleases, glycosylases and/or methylases and at least one transformable group which frees the recognition site after a transformation.</p>			
(57) Zusammenfassung <p>Verfahren zum Abbau von Nucleinsäuremolekülen, wobei in einem abzubauenen Nucleinsäuremolekül Nucleoside des abzubauenen Nucleinsäuremoleküls durch eine chemische Modifikationsreaktion in Nucleosidanaloga umgewandelt werden, die von Nucleinsäure-Glycosylasen als deren Substrat erkannt werden; Zugabe der Nucleinsäure-Glycosylase zu einer Probe, in der das abzubauenen Nucleinsäuremolekül vorhanden ist und die abzubauenen Nucleinsäure durch Reaktion der zugegebenen Nucleinsäure-Glycosylase abgebaut wird. Des weiteren werden Nucleinsäureverbindungen offenbart, bei denen in der Polymerkette mindestens eine Struktureinheit vorgesehen ist, die mindestens eine Erkennungsstelle für Nucleasen, Glycosylasen, und/oder Methylasen und mindestens eine transformierbare Gruppe aufweist, die nach einer Transformation die Erkennungsstelle freilegt.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BG	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BJ	Benin	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BR	Brasilien	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BY	Belarus	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
CA	Kanada	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LJ	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
RE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

**Verfahren und Nucleinsäureverbindung zum Abbau
von in-vitro synthetisierten Nucleinsäuremolekülen**

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zum Abbau von Nucleinsäuremolekülen und Nucleinsäureverbindungen, bei der in der Polymerkette mindestens eine Struktureinheit vorgesehen ist, die nach chemischer Modifikation mindestens eine Erkennungsstelle für Nucleasen, Glycosylasen oder andere Nucleinsäuremodifizierende Enzyme aufweist.

Durch die äußerst hohe Sensitivität des PCR-Verfahrens besteht ein enormes Risiko der Kontamination des Arbeitsplatzes und damit neuer Reaktionsansätze mit Amplifikaten vorangegangener Analysen. Zur Eindämmung oder Verhinderung der Kontaminationsgefahr wird in WO 92/01814 (Cetus) bzw. US 5,035,996 und US 5,683,896 (Life Technologies) vorgeschlagen, Kontaminationen in Reaktionsansätzen zur DNA-Amplifikation dadurch zu kontrollieren, dass in die entstehenden Amplifikate bzw. verwendeten Starter-Oligonucleotide bestimmte Derivate von Nucleotidresten (z. B. Desoxyuridin) eingebaut werden. Vor einer neuen Amplifikationsreaktion können dann eventuell im Reaktionsansatz befindliche Amplifikationsprodukte aus vorangegangenen Amplifikationen dadurch entfernt werden, dass durch Verwendung von geeigneten Enzymen (z.B. Uracil-DNA-Glycosylase, UDG) Strangbrüche in den Amplifikationsprodukten an der Stelle erzeugt werden, wo die Derivate von Nucleotidresten bzw. diese enthaltene Starter-Oligonucleotide eingebaut wurden.

Der Nachteil dieser Verfahren besteht darin, daß das zur Anwendung kommende Enzym (UDG) vor Beginn der neuen Amplifikation inaktiviert werden muß, damit es die neu entstehenden Amplifikate nicht angreift. In der Praxis hat sich herausgestellt, daß diese Inaktivierung meist nur partiell gelingt, wodurch die Effektivität der

anschließenden Amplifikation, gemessen an der entstehenden Amplifikatmenge, zum Teil dramatisch verringert wird. Wie sich in der experimentellen Praxis gezeigt hat, konnte dieser Nachteil auch durch Verwendung von in ihrer Thermostabilität modifizierten Enzymen (hier UDG) nicht restlos aufgehoben werden.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren bereitzustellen und Verbindungen anzugeben, mit denen die im Stand der Technik aufgetretenen Nachteile vermieden werden können.

Erfindungsgemäß wird dies erreicht durch ein Verfahren zum Abbau von Nucleinsäuremolekülen, wobei

- in einem abzubauenen Nucleinsäuremolekül Nucleoside des abzubauenen Nucleinsäuremoleküls durch eine chemische Modifikationsreaktion in Nucleosidanaloga umgewandelt werden, die von einer Nucleinsäure-Glycosylase als deren Substrat erkannt werden,
- Zugabe der Nucleinsäure-Glycosylase zu einer Probe in der das abzubauenen Nucleinsäuremolekül vorhanden ist und
- die abzubauenen Nucleinsäure durch Reaktion der zugegebenen Nucleinsäure-Glycosylase abgebaut wird.

Die Nucleoside, die in den abzubauenen Nucleinsäuremolekülen als Substrat für die Nucleinsäureglycosylase dienen sollen, können durch eine chemische Modifikationsreaktion in ein Substrat für Glycosylasen überführt werden. Es kommen dabei folgende Basen als Substrat in Betracht:

3-Alkyladenin, 8-Hydroxyadenin, 3-Alkylguanin, 7-Alkylguanin, 8-Hydroxyguanin, Hypoxanthin, 8-Hydroxyinosin, 8-Hydroxynebularin, 5-Hydroxycytidin, 6-

Hydroxy-5,6-dihydrocytidin, 5-Hydroxymethylcytosin, 5,6-Dihydrothymin, 5-Hydroxy-6-hydrothymin, Thyminglycol, Uracil, 5,6-Dihydrouracil, 5-Hydroxy-6-hydrouracil, 5-Hydroxyuracil, Uracilglycol, 5-Formyluracil, 5-Hydroxymethyluracil, Formamidopyrimidinbasen, Harnstoff-Derivate, Pyrimidin-Dimere, Alloxan, 5-Hydroxyhydantoin, trans-1-Carbamoyl-2-oxo-4,5-dihydroxy-imidazolidin, 5-Hydroxy-5-methylhydantoin.

Besonders bevorzugt sind Modifizierungsreaktionen, die nach einer chemischen Modifikationsreaktion die folgenden Nucleosidanaloga ergeben: Uracil, 5-Formyluracil, 5-Hydroxymethylcytosin, 2,6-Diamino-4-oxo-(N-methylformamido)pyrimidin, Hydroxymethyluracil, Hypoxanthin.

Besonders bevorzugt ist die Zugabe der folgenden Enzyme:

3-Methyladenin-DNA-Glycosylase I, 5,6-Dihydrothymin-DNA-Glycosylase, 5-Hydroxymethylcytosin-DNA-Glycosylase, 8-Oxoguanin-DNA-Glycosylase, Cytosin-DNA-Glycosylase, Endonuclease III, Endonuclease V, Endonuclease VIII, Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase, Harnstoff-DNA-Glycosylase, Hypoxanthin-DNA-Glycosylase, N-Alkylpurin-DNA-Glycosylase, N-Methylpurin-DNA-Glycosylase, Pyrimidindimer-DNA-Glycosylase, Thymidin-DNA-Glycosylase, Uracil-DNA-Glycosylase.

Insbesondere bevorzugt sind als Enzyme 3-Methyladenin-DNA-Glycosylase II und 5-Hydroxymethyluracil-DNA-Glycosylase.

Es können auch rekombinant gewonnene Enzyme und/oder thermostabile Varianten der genannten Enzyme eingesetzt werden.

Die Wahl der Enzyme ist abhängig von der Art der durch die chemische Modifizierungsreaktion freigelegten Erkennungsstelle des Nucleosidanalogs, welches als

Substrat für das einzusetzende Enzym eingesetzt wird. Umgekehrt kann, wenn ein bestimmtes Nucleosidanalogue in die abzubauen Nucleinsäure eingefügt wurde, das entsprechende Enzym mit der dazugehörigen Substratspezifität ausgesucht werden. Dies bedeutet eine hohe Flexibilität, die der Anwender durch das erfindungsgemäße Verfahren erhält.

Erfindungsgemäß können insbesondere in-vitro synthetisierte Nucleinsäuren abgebaut werden. Vorzugsweise wird in die in-vitro synthetisierte Nucleinsäure ein seltenes oder künstliches Nucleosid eingebaut, das durch die oben erwähnte chemische Modifikationsreaktion zu einem Analogue umgewandelt wird, das durch die genannten Nucleinsäurenglycosylasen als Substrat erkannt wird.

Bevorzugterweise wird das seltene oder künstliche Nucleosid durch Verwendung des entsprechenden Nucleosidtriphosphates während der in-vitro Synthese eingebaut. Dabei kann das seltene oder künstliche Nucleosid auch als Bestandteil des Starter-Oligonucleotids in das Syntheseprodukt eingebaut werden.

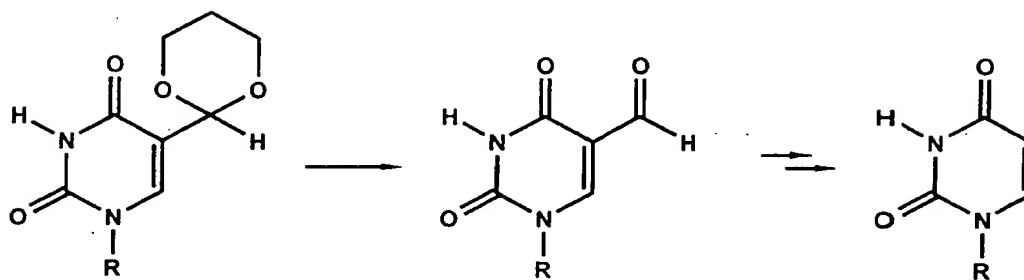
Das erfindungsgemäße Verfahren ist insbesondere für den Abbau von Desoxyribonucleinsäuren geeignet.

Als chemische Modifikationsreaktion kommt erfindungsgemäß insbesondere eine Modifikationsreaktion in Betracht, die zur Bildung von Inosin-, Uridin-, 5-hydroxymethyluridin- oder 5-Formyluridin-Resten in der abzubauen Nucleinsäure führt.

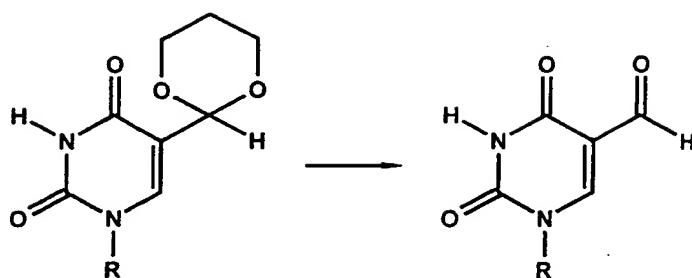
Nachstehende Beispiele betreffen bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens. Die erfindungsgemäßen Bausteine sind zur besseren Übersicht hier als freie Basen aufgeführt.

Beispiel A

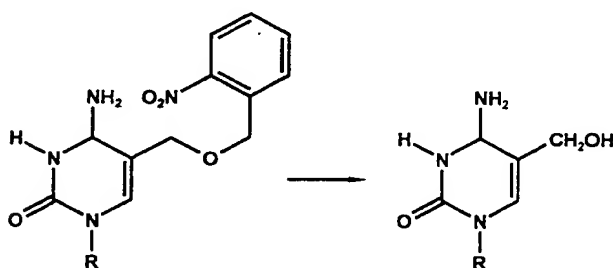
Einbau: 5-(2-(1,3-Dioxanyl))-uracil
Reaktionen: schwach saure Hydrolyse zum 5-Formyluracil
Oxidation zur Uracil-5-carbonsäure
Decarboxylierung
Substratbase: Uracil
Enzym: Uracil-DNA-Glycosylase oder
Cytosin-DNA-Glycosylase oder
Thymin-DNA-Glycosylase oder
Hydroxymethyl-DNA-Glycosylase

**Beispiel B**

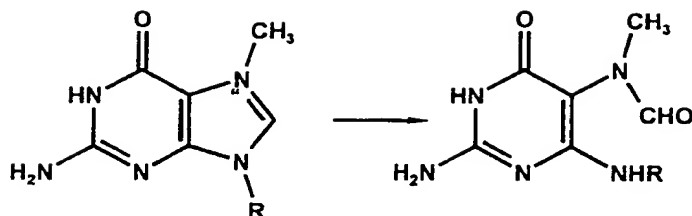
Einbau: 5-(2-(1,3-Dioxanyl))-uracil
Reaktionen: schwach saure Hydrolyse
Substratbase: 5-Formyluracil
Enzym: 3-Methyladenin-DNA-Glycosylase II

**Beispiel C**

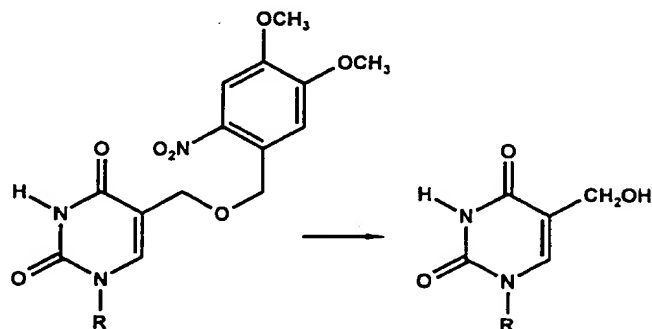
Einbau: 5-(o-Nitrobenzoyl)methylcytosin
 Reaktionen: Photolyse
 Substratbase: 5-Hydroxymethylcytosin
 Enzym: 5-Hydroxymethylcytosin-DNA-Glycosylase oder
 Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase oder
 Endonuclease VIII

**Beispiel D**

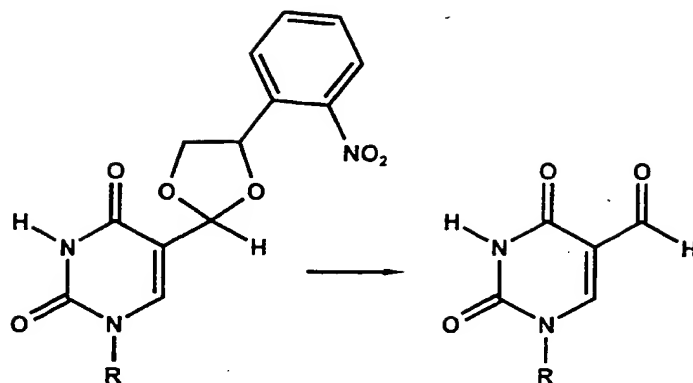
Einbau: 7-Methylguanin
 Reaktionen: Teilabbau durch (katalytische) Oxidation oder Photooxidation
 Substratbase: 2,6-Diamino-4-oxo-(N-methylformamido)pyrimidin
 Enzym: Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase

**Beispiel E**

Einbau: 5-(6-Nitroveratryloxy)methyluracil
 Reaktionen: Photolyse
 Substratbase: Hydroxymethyluracil
 Enzym: 5-Hydroxymethyluracil-DNA-Glycosylase oder
 3-Methyladenin-DNA-Glycosylase II

**Beispiel F**

Einbau: 5-(4-[2-Nitrophenyl])-1,3-dioxolanylmethyluracil
 Reaktionen: Photolyse
 Substratbase: Formyluracil
 Enzym: 3-Methyladenin-DNA-Glycosylase II

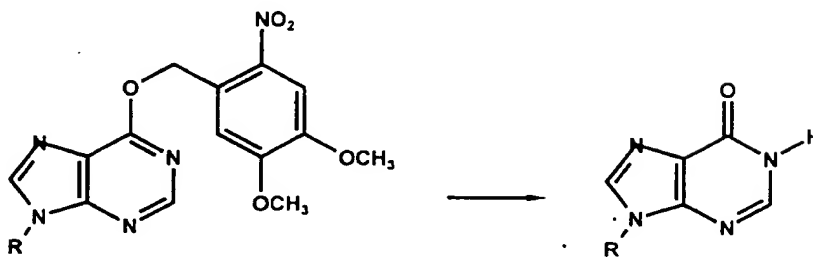
**Beispiel G**

Einbau: 6-(2-Nitroveratryloxy)purin

Reaktionen: Photolyse

Substratbase: Hypoxanthin

Enzym: 3-Methyladenin-DNA-Glycosylase II



Erfindungsgemäß beansprucht werden auch Nucleinsäureverbindungen, bei denen in der Polymerkette mindestens eine Struktureinheit vorgesehen ist, die mindestens eine Erkennungsstelle für Nucleasen, Glycosylasen, und/oder Methylasen und min-

destens eine transformierbare Gruppe aufweist, die nach einer Transformation die Erkennungsstelle freilegt.

Die als Substrat für den enzymatischen Abbau geeigneten Nucleoside entstehen durch chemische, insbesondere, photochemische sowie biochemische, insbesondere enzymatische Reaktionen an anderen inkorporierten natürlichen, seltenen und/oder künstlichen Nucleosiden. Nach den genannten Reaktionen werden diese durch Enzyme ausgeschnitten, die vor den Reaktionen mit ihnen nicht reagieren. Erfindungsgemäß wird so der Zeitpunkt des enzymatischen Abbaus exakt festlegbar.

Die erfindungsgemäß beanspruchte Nucleinsäureverbindung kann zum Beispiel in Form eines Oligomers oder eines Polymers vorliegen. Als Oligomer kommen insbesondere Primer (Oligonucleotide mit einer Länge von 5 bis 100 Basen, vorzugsweise 15 bis 40 Basen) in Betracht, wohingegen das Polymer insbesondere als Amplikon von 10 bis 100.000 Basenpaaren vorliegen kann mit einer Länge von vorzugsweise 200 bis 2.000 Basenpaaren.

Die erfindungsgemäße Nucleinsäureverbindung weist als Struktureinheit einen atypischen Nucleosidrest und/oder eine atypische Base, die C-, N-glycosidisch verknüpft ist mit einem Zuckerbaustein der Gruppe der Pentosen und Hexosen oder der Desoxypentosen und Desoxyhexosen, auf.

Ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nucleinsäure mit einer Erkennungsstelle in Form einer modifizierten Base der Nucleinsäurekette, insbesondere Uracil, 5-Uracilcarbonsäure, Hypoxanthin, 5-Formyluracil, 5-Hydroxymethylcytosin, 5-Hydroxymethyluracil.

Als erfindungsgemäße Verbindungen, die in die in-vitro synthetisierten Nucleinsäuremoleküle eingebaut werden und die nach deren Einbau als transformierbare Gruppe wirken, werden Verbindungen der Formel B-R bevorzugt, wobei

B eine atypische Base ist und

R die nachstehende Bedeutung hat

Wasserstoff, 2'-Desoxyribofuranosyl, Ribofuranosyl, 5'-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyribofuranosyl, 5'-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-ribofuranosyl, 5'-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-phosphoramidyl-2'-desoxyribofuranosyl, 5'-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-phosphoramidyl-ribofuranosyl, 5'-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-phosphoramidyl-2'-tri-methylsilylribofuranosyl, 5'-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-phosphoramidyl-2'-tert.butyl-dimethylsilylribofuranosyl, 5'-Triphosphato-2'-desoxyribofuranosyl.

Als atypische Base kommen in den erfindungsgemäßen Verbindungen, die praktisch ein Zwischenprodukt auf dem Weg zur abzubauenen Nucleinsäure darstellen, folgende Basen als atypische Basen in Betracht:

5-(2-(1,3-Dioxanyl))-uracil, 5-(2-Nitrobenzoxymethyl)cytosin, 5-(4-Methoxy-2-nitrobenzoxymethyl)cytosin, 5-(4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzoxymethyl)cytosin [= 5-(6-Nitroveratryloxy)methylcytosin], 5-(2-Nitrobenzoxymethyl)uracil, 5-(4-Methoxy-2-nitrobenzoxymethyl)uracil, 5-(4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzoxymethyl)uracil [= 5-(6-Nitroveratryloxy)methyluracil], 5-(2-(4-(2-Nitrophenyl)-1,3-dioxolanyl)methyl)uracil, 6-(2-Nitrobenzoxymethyl)purin, 6-(4-Methoxy-2-nitrobenzoxymethyl)purin, 6-(4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzoxymethyl)purin [= 5-(6-Nitroveratryloxy)methylpurin].

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt, unerwünschte Nucleinsäuremoleküle, die durch in-vitro-Synthese, z.B. PCR entstanden sind, abzubauen, um z.B. eine Kontamination neuer Syntheseansätze mit den Produkten vorangegangener Analysen auszuschließen. Der Vorteil gegenüber bisher bekannten Verfahren (z.B. WO 92/01814) besteht darin, daß der enzymatische Abbau der zu hydrolysierenden

Nucleinsäure erst dadurch ermöglicht wird, daß zunächst durch eine geeignete chemische Reaktion bestimmte Nucleinsäurebausteine modifiziert werden, wodurch diese zum Substrat für das gewählte Enzym werden. Dadurch ist es möglich, Zeitpunkt und Stelle des Nucleinsäureabbaus durch einfache chemische Modifikation der vorliegenden unerwünschten Nucleinsäuremoleküle vorherzubestimmen. Die zu modifizierenden und abzubauenen Nucleinsäurebausteine können in das während der in-vitro-Synthese entstehende Produkt sowohl als Nucleosidtriphosphat als auch als Bestandteil des Starter-Oligonucleotids eingebaut werden. Das Verfahren bietet den Vorteil, das Nucleinsäure-abbauende Enzym unabhängig vom Zeitpunkt der Hydrolyse zum Reaktionsansatz geben zu können und nach Hydrolyse nicht inaktivieren zu müssen. Die betreffenden Nucleinsäurebausteine können sowohl bei in-vitro-Synthesen übliche oder seltene Nucleoside als auch synthetische Nucleosidanaloga sein.

Die Erfindung wird anhand des folgenden Ausführungsbeispiels näher erläutert.

Ausführungsbeispiel:

Abkürzungen:

AlkA	3-Methyladenin-DNA-Glycosylase II
DdU	5-(2-(1,3-Dioxanyl))-2'desoxyuridin
DdUTP	DdU-5'-triphosphat
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat

Die Synthese und der Einbau des DdUTP in eine Nucleotidkette erfolgt z.B. gemäß DD265429.

Zur Demonstration der Wirksamkeit des Verfahrens zum Abbau von in-vitro synthetisierten Nucleinsäuren wird im ersten Schritt eine PCR (polymerase chain reaction) durchgeführt. Dabei wird ein Gemisch von dNTP

(desoxynucleosidtriphosphaten) eingesetzt (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), bei dem das dTTP durch eine Mischung von DdUTP und dTTP im Mischungsverhältnis 1:3 ersetzt wurde. Die Gesamtkonzentration von DdUTP und dTTP ist dabei gleich der Einzelkonzentration der drei anderen dNTP. Nach Abschluß dieser Amplifikation wird das Gemisch 1:100 verdünnt und je 5 µl der Verdünnung in 3 neue Reaktionsgefäße gegeben. Dazu werden 5 µl einer Pufferlösung (pH 2,0) pipettiert, nach Mischung 10 min bei 50°C inkubiert und nach Abkühlen auf Raumtemperatur mit 5 µl einer Pufferlösung (pH 10,0) annähernd neutralisiert. Zu den annähernd neutralen Lösungen wird ein PCR-Mastermix gegeben, der bei zwei der Reaktionsgefäße neben der Taq-Polymerase eine Einheit des Enzyms AlkA enthält. Zum dritten Reaktionsgefäß wird ein herkömmlicher Mastermix ohne AlkA zugegeben. Zu einem der Reaktionsgefäße mit AlkA im Mastermix werden 5 µl Template-DNA (aus *E. coli*) und zu den anderen zwei je 5 µl Reinstwasser pipettiert. Das Volumen aller Ansätze wird nun mit Reinstwasser auf 50 µl aufgefüllt. Die Reaktionsansätze werden 15 min bei 20°C inkubiert und anschließend die PCT gestartet.

Der Erfolg der Dekontaminationsbehandlung wird im Vergleich der PCR-Ansätze mit Zugabe von AlkA deutlich. Nur der Ansatz enthält ein Amplifikat, dem entsprechende Template-DNA zugegeben worden war. Im Ansatz ohne AlkA und ohne Template-DNA ist ebenfalls ein Produkt nachweisbar, welches hier aber von der künstlichen Kontamination herrührt, die ohne AlkA nicht zerstört wurde.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Abbau von Nucleinsäuremolekülen, wobei
 - in einem abzubauenen Nucleinsäuremolekül Nucleoside des abzubauenen Nucleinsäuremoleküls durch eine chemische Modifikationsreaktion in Nucleosidanaloga umgewandelt werden, die von Nucleinsäure-Glycosylasen als deren Substrat erkannt werden,
 - Zugabe der Nucleinsäure-Glycosylase zu einer Probe, in der das abzubauenende Nucleinsäuremolekül vorhanden ist und
 - die abzubauenende Nucleinsäure durch Reaktion der zugegebenen Nucleinsäure-Glycosylase abgebaut wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den abzubauenen Nucleinsäuremolekülen um in-vitro synthetisierte Nucleinsäuremoleküle handelt.
3. Verfahren nach Anspruch 2, gekennzeichnet dadurch, dass in die in-vitro-synthetisierte Nucleinsäure der Einbau eines seltenen oder künstlichen Nucleosids erfolgt, das durch die folgende chemische Modifikationsreaktion zu einem Analogon umgewandelt wird, das durch Nucleinsäure-Glycosylasen als Substrat erkannt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3, gekennzeichnet dadurch, dass der Einbau eines seltenen oder künstlichen Nucleosids durch Verwendung des entsprechenden Nucleosidtriphosphats während der in-vitro-Synthese erfolgt.

5. Verfahren nach Anspruch 3, gekennzeichnet dadurch, dass der Einbau eines seltenen oder künstlichen Nucleosids dadurch erfolgt, dass dieses als Bestandteil des Starter-Oligonucleotids in das Syntheseprodukt eingefügt wird.
6. Verfahren nach Anspruch 1 bis 5, gekennzeichnet dadurch, dass es sich bei der abzubauenen Nucleinsäure um Desoxyribonucleinsäure handelt.
7. Verfahren nach Anspruch 6, gekennzeichnet dadurch, dass die chemische Modifikationsreaktion zur Bildung von Inosin-, Uridin-, 5-Hydroxymethyluridin- oder 5-Formyluridinresten in der abzubauenen Nucleinsäure führt.
8. Verfahren nach Anspruch 7, gekennzeichnet dadurch, dass als Nucleinsäureglycosylase 3-Methyladenin-DNA-Glycosylase II und/oder 5-Hydroxymethyluracil-DNA-Glycosylase verwendet wird.
9. Verfahren nach Anspruch 8, gekennzeichnet dadurch, dass es sich bei der 3-Methyladenin-DNA-Glycosylase II oder 5-Hydroxymethyluracil-DNA-Glycosylase um ein rekombinant gewonnenes Enzym und/oder um eine thermostabile Variante dieses Enzyms handelt.
10. Nucleinsäureverbindung, bei der in der Polymerkette mindestens eine Struktureinheit vorgesehen ist, die mindestens eine Erkennungsstelle für Nucleasen, Glycosylasen, und/oder Methylasen und mindestens eine transformierbare Gruppe aufweist, die nach einer Transformation die Erkennungsstelle freilegt.
11. Nucleinsäureverbindung nach Anspruch 10, bei der die transformierbare Gruppe mittels chemischer, insbesondere photolytischer oder enzymatischer Abspaltungsreaktion die Erkennungsstelle für Nucleasen freilegt

12. Nucleinsäureverbindung nach einem der Ansprüche 10 oder 11 in Form eines Oligomers, insbesondere eines Primers, wie eines Oligonucleotids einer Länge von 5 bis 100 Basen, vorzugsweise 15 bis 40 Basen, oder in Form eines Polymers, insbesondere eines Amplicons vorzugsweise mit einer Länge von 10 bis 100.000 Basenpaaren, vorzugsweise 200 bis 2.000 Basenpaaren.
13. Nucleinsäureverbindung nach einem der Ansprüche 10 bis 12, wobei die Struktureinheit ein atypischer Nucleosidrest und/oder eine atypische Base C-N-glycosidisch verknüpft mit einem Zuckerbaustein der Gruppe der Pentosen und Hexosen oder der Desoxypentosen und Desoxyhexosen ist.
14. Nucleinsäureverbindung nach einem der Ansprüche 10 bis 13, wobei die Erkennungsstelle eine modifizierte Base der Nucleinsäurekette, insbesondere Uracil, 5-Uracilcarbonsäure, Hypoxanthin, 5-Formyluracil, 5-Hydroxymethylcytosin, 5-Hydroxymethyluracil ist.
15. Verbindung zum Einbau in eine Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 10 bis 14 mit der Formel B-R, die nach dem Einbau als transformierbare Gruppe wirkt, wobei

B eine atypische Base ist und

R die nachstehende Bedeutung hat

Wasserstoff, 2'-Desoxyribofuranosyl, Ribofuranosyl, 5'-(4,4'-Dimethoxytriphenyl-methyl)-2'-desoxyribofuranosyl, 5'-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-ribofuranosyl, 5'-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-phosphoramidityl-2'-desoxyribofuranosyl, 5'-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-phosphoramidityl-ribofuranosyl, 5'-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-phosphorami-

dityl-2'-tri-methylsilylribofuranosyl, 5'-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-phosphoramidityl-2'-tert.butyl dimethylsilylribofuranosyl, 5'-Triphosphato-2'-desoxyribofuranosyl.

16. Nucleinsäureverbindung nach einem der Ansprüche 10 bis 15 wobei die atypische Base eine der folgenden Basen

5-(2-(1,3-Dioxanyl))-uracil, 5-(2-Nitrobenzoxy)methylcytosin, 5-(4-Methoxy-2-nitrobenzoxy)methylcytosin, 5-(4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzoxy)methylcytosin [= 5-(6-Nitroveratryloxy)methylcytosin], 5-(2-Nitrobenzoxy)methyluracil, 5-(4-Methoxy-2-nitrobenzoxy)methyluracil, 5-(4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzoxy)methyluracil [= 5-(6-Nitroveratryloxy)methyluracil], 5-(2-(4-(2-Nitrophenyl)-1,3-dioxolanyl))methyluracil, 6-(2-Nitrobenzoxy)purin, 6-(4-Methoxy-2-nitrobenzoxy)purin, 6-(4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzoxy)purin [= 5-(6-Nitroveratryloxy)purin] ist.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/02248

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 6	C12Q1/68 C07D473/30	C07H19/06 C07H19/00
C07H19/16	C07D405/04	C07D239/54
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 6 C12Q C07H C07D		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DD 265 429 A (ADL INST PHYTOPATHOLOGIE) 1 March 1989 (1989-03-01) cited in the application	15, 16
Y	abstract; claims 1,5-7; examples 1,2 ---	1-14
X	WO 92 01814 A (CETUS CORP) 6 February 1992 (1992-02-06) cited in the application	15
Y	the whole document ---	1-14
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
23 August 1999		03/09/1999
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Knehr, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No
PCT/EP 99/02248

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LONGO M C ET AL: "USE OF URACIL DNA GLYCOSYLASE TO CONTROL CARRY-OVER CONTAMINATION IN POLYMERASE CHAIN REACTIONS" GENE, vol. 93, no. 1, 1 January 1990 (1990-01-01), pages 125-128, XP000371626 ISSN: 0378-1119	15
Y	the whole document	1-7, 10-14
X	US 5 683 896 A (HARTLEY JAMES L ET AL) 4 November 1997 (1997-11-04) cited in the application	15
Y	the whole document	1,2,4-6, 10,12-14
X	WO 97 12061 A (EPICENTRE TECHNOLOGIES CORP) 3 April 1997 (1997-04-03)	15
Y	the whole document	1,2,4-7, 10,12-14
X	ZHANG Q-M ET AL.: "Replication of DNA templates containing 5-formyluracil, a major oxidative lesion of thymine in DNA" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 25, no. 20, 1997, pages 3969-3973, XP002113020	10-15
X	SUGIYAMA H ET AL.: "New synthetic method of 5-Formyluracil-containing oligonucleotides and their melting behaviour" TETRAHEDRON LETTERS, vol. 37, no. 50, 1996, pages 9067-9070, XP002113021	10,11, 13-15
X	ONO A ET AL.: "Nucleosides and nucleotides. 131. Synthesis and properties of oligonucleotides containing 5-formyl-2'-deoxyuridine" CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETINS, vol. 42, no. 11, 1994, pages 2231-2237, XP002113022	10,11, 13-15
A	abstract page 2231, column 1, paragraph 1 - page 2233, column 2, paragraph 1; figures 1,2 EP 0 624 643 A (BECTON DICKINSON CO) 17 November 1994 (1994-11-17)	
	the whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

National Application No

PCT/EP 99/02248

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DD 265429	A	01-03-1989	NONE	
WO 9201814	A	06-02-1992	AT 176002 T	15-02-1999
			AU 665338 B	04-01-1996
			AU 8532791 A	18-02-1992
			CA 2087724 A	25-01-1992
			DE 69130800 D	04-03-1999
			EP 0540693 A	12-05-1993
			ES 2128323 T	16-05-1999
			US 5310652 A	10-05-1994
			US 5618703 A	08-04-1997
			US 5641864 A	24-06-1997
			US 5693517 A	02-12-1997
			US 5561058 A	01-10-1996
			US 5795762 A	18-08-1998
			US 5418149 A	23-05-1995
			US 5466591 A	14-11-1995
			JP 6501612 T	24-02-1994
US 5683896	A	04-11-1997	US 5035996 A	30-07-1991
			AT 159764 T	15-11-1997
			CA 2073298 A	13-01-1993
			DE 69222897 D	04-12-1997
			DE 69222897 T	01-10-1998
			EP 0522884 A	13-01-1993
			ES 2109983 T	01-02-1998
			GR 3025964 T	30-04-1998
			JP 2103155 C	22-10-1996
			JP 6090755 A	05-04-1994
			JP 8011070 B	07-02-1996
			AT 127855 T	15-09-1995
			CA 2017522 A,C	01-12-1990
			DE 69022291 D	19-10-1995
			DE 69022291 T	07-03-1996
			DK 401037 T	05-02-1996
			EP 0401037 A	05-12-1990
			ES 2040199 T	01-11-1995
			GR 92300019 T	25-08-1992
			GR 3018005 T	29-02-1996
			JP 1979468 C	17-10-1995
			JP 3058785 A	13-03-1991
			JP 7004248 B	25-01-1995
			AT 131878 T	15-01-1996
			CY 2073 A	11-09-1998
			DE 69024286 D	01-02-1996
			DE 69024286 T	30-05-1996
			DK 415755 T	22-01-1996
			EP 0415755 A	06-03-1991
			ES 2080807 T	16-02-1996
			GR 3019092 T	31-05-1996
			HK 1000380 A	13-03-1998
			JP 2059842 C	10-06-1996
			JP 3091484 A	17-04-1991
			JP 7089932 B	04-10-1995
WO 9712061	A	03-04-1997	AU 704625 B	29-04-1999
			AU 7118396 A	17-04-1997
			CA 2233079 A	03-04-1997

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

national Application No

PCT/EP 99/02248

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9712061 A		EP 0854936 A	29-07-1998
EP 0624643 A	17-11-1994	CA 2122203 A	12-11-1994
		JP 2527533 B	28-08-1996
		JP 6319599 A	22-11-1994
		SG 44809 A	19-12-1997
		US 5470723 A	28-11-1995
		US 5536649 A	16-07-1996
		US 5561044 A	01-10-1996
		US 5736365 A	07-04-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/02248

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 6 C12Q1/68 C07H19/06 C07H19/16 C07D405/04 C07D239/54 C07D473/30 C07H19/00		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikations Symbole) IPK 6 C12Q C07H C07D		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DD 265 429 A (ADL INST PHYTOPATHOLOGIE) 1. März 1989 (1989-03-01) in der Anmeldung erwähnt	15, 16
Y	Zusammenfassung; Ansprüche 1,5-7; Beispiele 1,2	1-14
X	W0 92 01814 A (CETUS CORP) 6. Februar 1992 (1992-02-06) in der Anmeldung erwähnt	15
Y	das ganze Dokument	1-14
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "A" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 23. August 1999		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 03/09/1999
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Beauftragter Knehr, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aldenzeichen

PCT/EP 99/02248

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	LONGO M C ET AL: "USE OF URACIL DNA GLYCOSYLASE TO CONTROL CARRY-OVER CONTAMINATION IN POLYMERASE CHAIN REACTIONS" GENE, Bd. 93, Nr. 1, 1. Januar 1990 (1990-01-01), Seiten 125-128, XP000371626 ISSN: 0378-1119	15
Y	das ganze Dokument	1-7, 10-14
X	US 5 683 896 A (HARTLEY JAMES L ET AL) 4. November 1997 (1997-11-04) in der Anmeldung erwähnt	15
Y	das ganze Dokument	1,2,4-6, 10,12-14
X	WO 97 12061 A (EPICENTRE TECHNOLOGIES CORP) 3. April 1997 (1997-04-03)	15
Y	das ganze Dokument	1,2,4-7, 10,12-14
X	ZHANG Q-M ET AL.: "Replication of DNA templates containing 5-formyluracil, a major oxidative lesion of thymine in DNA" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 25, Nr. 20, 1997, Seiten 3969-3973, XP002113020	10-15
X	SUGIYAMA H ET AL.: "New synthetic method of 5-Formyluracil-containing oligonucleotides and their melting behaviour" TETRAHEDRON LETTERS, Bd. 37, Nr. 50, 1996, Seiten 9067-9070, XP002113021	10,11, 13-15
X	ONO A ET AL.: "Nucleosides and nucleotides. 131. Synthesis and properties of oligonucleotides containing 5-formyl-2'-deoxyuridine" CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETINS, Bd. 42, Nr. 11, 1994, Seiten 2231-2237, XP002113022 Zusammenfassung Seite 2231, Spalte 1, Absatz 1 - Seite 2233, Spalte 2, Absatz 1; Abbildungen 1,2	10,11, 13-15
A	EP 0 624 643 A (BECTON DICKINSON CO) 17. November 1994 (1994-11-17) das ganze Dokument	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/02248

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DD 265429 A	01-03-1989	KEINE	
WO 9201814 A	06-02-1992	AT 176002 T	15-02-1999
		AU 665338 B	04-01-1996
		AU 8532791 A	18-02-1992
		CA 2087724 A	25-01-1992
		DE 69130800 D	04-03-1999
		EP 0540693 A	12-05-1993
		ES 2128323 T	16-05-1999
		US 5310652 A	10-05-1994
		US 5618703 A	08-04-1997
		US 5641864 A	24-06-1997
		US 5693517 A	02-12-1997
		US 5561058 A	01-10-1996
		US 5795762 A	18-08-1998
		US 5418149 A	23-05-1995
		US 5466591 A	14-11-1995
		JP 6501612 T	24-02-1994
US 5683896 A	04-11-1997	US 5035996 A	30-07-1991
		AT 159764 T	15-11-1997
		CA 2073298 A	13-01-1993
		DE 69222897 D	04-12-1997
		DE 69222897 T	01-10-1998
		EP 0522884 A	13-01-1993
		ES 2109983 T	01-02-1998
		GR 3025964 T	30-04-1998
		JP 2103155 C	22-10-1996
		JP 6090755 A	05-04-1994
		JP 8011070 B	07-02-1996
		AT 127855 T	15-09-1995
		CA 2017522 A,C	01-12-1990
		DE 69022291 D	19-10-1995
		DE 69022291 T	07-03-1996
		DK 401037 T	05-02-1996
		EP 0401037 A	05-12-1990
		ES 2040199 T	01-11-1995
		GR 92300019 T	25-08-1992
		GR 3018005 T	29-02-1996
		JP 1979468 C	17-10-1995
		JP 3058785 A	13-03-1991
		JP 7004248 B	25-01-1995
		AT 131878 T	15-01-1996
		CY 2073 A	11-09-1998
		DE 69024286 D	01-02-1996
		DE 69024286 T	30-05-1996
		DK 415755 T	22-01-1996
		EP 0415755 A	06-03-1991
		ES 2080807 T	16-02-1996
		GR 3019092 T	31-05-1996
		HK 1000380 A	13-03-1998
		JP 2059842 C	10-06-1996
		JP 3091484 A	17-04-1991
		JP 7089932 B	04-10-1995
WO 9712061 A	03-04-1997	AU 704625 B	29-04-1999
		AU 7118396 A	17-04-1997
		CA 2233079 A	03-04-1997

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

ationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/02248

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9712061 A		EP 0854936 A	29-07-1998
EP 0624643 A	17-11-1994	CA 2122203 A	12-11-1994
		JP 2527533 B	28-08-1996
		JP 6319599 A	22-11-1994
		SG 44809 A	19-12-1997
		US 5470723 A	28-11-1995
		US 5536649 A	16-07-1996
		US 5561044 A	01-10-1996
		US 5736365 A	07-04-1998